

Docket No. 203973US0X/sdc



O.I.P.E.



#4

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Bettina MOECKEL

GAU: 1645

SERIAL NO: 09/867,537

EXAMINER:

FILED: May 31, 2001

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE LYSR3 GENE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

RECEIVED
NOV 23 2001
TECH CENTER 1600/2900

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☐ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	100 39 049.8	August 10, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

WILLIAM E. BEAUMONT
REGISTRATION NUMBER 30,996

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



09/867,537
RECEIVED
NOV 23 2001
TECH CENTER 1600/2900

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 39 049.8

Anmeldetag: 10. August 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktien-
gesellschaft, Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Neue für das lysR3-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen

IPC: C 07 H, C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weihmayer

Neue für das lysR3-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das lysR3-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, durch Abschwächung des lysR3-Gens. Das lysR3-Gen kodiert für das LysR3-Protein, welches ein Transkriptionsregulator der LysR-Familie ist.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure-produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, bereitzustellen.

10 Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das lysR3-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 15 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
- 20 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
- 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators LysR3 aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1 oder
- 5 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- 10 (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind:

eine replizierbare DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;

- 15 ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, Punkt d, insbesondere pCR2.11lysR3int, hinterlegt in Escherichia coli DSM 13618 bei der DSMZ, Braunschweig (Deutschland);

und coryneforme Bakterien, die in dem lysR3-Gen eine Insertion oder Deletion, insbesondere unter Verwendung des Vektors pCR2.11lysR3int, enthalten.

- 25 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält
- 30 mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten

Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um
5 Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für das LysR3-Protein kodieren oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des lysR3-Gens aufweisen.

10 Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das LysR3-Protein kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide
15 enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld
20 herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

25 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der
30 biologischen Aktivität des LysR3-Proteins und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem

Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

- Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere
- 5 L-Lysin und L-Valin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das lysR3-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.
- 10 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die
- 15 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.
- 20 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer
- 25 Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.
- 30 Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium melassecola ATCC17965
5 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
10 Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die
L-Lysin produzierenden Stämme

- Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
15 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum DM58-1
Corynebacterium glutamicum DG52-5
Corynebacterium glutamicum DSM 5714 und
20 Corynebacterium glutamicum DSM 12866

oder wie beispielsweise die L-Valin produzierenden Stämme

- Corynebacterium glutamicum DSM 12455
Corynebacterium glutamicum FERM-P 9325
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 9324
25 Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 1763.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das LysR3-Protein
kodierende lysR3-Gen von C. glutamicum, welches ein
Transkriptionsregulator der LysR-Familie ist, zu isolieren.

- Zur Isolierung des lysR3-Gens oder auch anderer Gene von
30 C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
Mikroorganismus in Escherichia coli (E. coli) angelegt. Das
Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel

seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pHc79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 α (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das lysR3-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des lysR3-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die

sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter
5 Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im
10 Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-
15 Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

20 Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des lysR3-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die
25 Expression des lysR3-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete
30 Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren,

- Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).
- 15 Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.
- 30 Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens
- 35

- einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren
- 5 Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers
- 10 („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.
- 15 Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung (gene disruption) und des Gen-Austauschs (gene replacement).
- 20 Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al.,
- 25 Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological
- 30 Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das
- 35 zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird

anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al.

(Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994))

5 beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

10 Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von
15 Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des *recA*-Gens von *C. glutamicum* verwendet.

In Figur 1 ist beispielhaft der Plasmidvektor pCR2.1lysR3int gezeigt, mit Hilfe dessen das *lysR3*-Gen
20 unterbrochen bzw. ausgeschaltet werden kann.

Bei der Methode des Genaustausches (gene replacement) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen
25 für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten
30 zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C.*
35 *glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

In das lysR3-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des lysR3-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphat-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

10 So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),

15 • das für die Enolase kodierende Gen eno (DE: 19947791.4),

- das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),

- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))

20

- das für den Lysin-Export kodierende Gen lyse (DE-A-195 48 222)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Außerdem kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des lysR3-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

25

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),

- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114)

5 abzuschwächen.

So kann beispielsweise zur Produktion von L-Valin

- gleichzeitig die für die Acetohydroxysäuresynthase kodierenden Gene ilvBN (Keilhauer et al., (1993) Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), oder
- 10 ◦ gleichzeitig das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende ilvD-Gen (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979), oder
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of
- 15 Biochemistry 254, 395 - 403 (1998))

überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des lysR3-Gens unerwünschte

- 20 Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind
25 ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere

L-Lysin und L-Valin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren

und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff- haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm TOP10F/pCR2.1lysR3int als DSM 13618.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und
5 L-Valin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische
10 Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

15 Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus C.
20 glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung
25 Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
30 (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1

Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
5 dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der
10 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La
15 Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der
20 Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin
25 ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens lysR3

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep
30 Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-

0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach

5 gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma
10 Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente
15 in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses
20 Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin
25 ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings
30 of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland)
35 verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und

Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem
"Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product
No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism
377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems
5 (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter
Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids
Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die
Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem
10 zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte
Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden,
1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.
Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs"
(Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research,
15 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des
"National Center for Biotechnology Information" (NCBI,
Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1
dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein
20 offenes Leseraster von 633 Basenpaaren, welches als lysR3-
Gen bezeichnet wurde. Das lysR3-Gen kodiert für ein
Polypeptid von 210 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die
25 Integrationsmutagenese des lysR3-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von
Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994))
chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für
C. glutamicum bekannten Sequenz des lysR3-Gens wurden die
30 folgenden Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion
ausgewählt:

lysR3intA:

5`GAT GTG GTG TTG ATG GAT CT 3`

lysR3intB:

5`TCA ATT TCT CTG GCA CTG AG 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der
5 Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein 323 bp großes internes Fragment des lysR3-Gens
10 isoliert, welches in der SEQ ID No. 3 dargestellt ist.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

15 Anschließend wurde der E. coli Stamm TOP10F mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des
20 Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des
25 QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1lysR3int genannt.

Beispiel 4

30 Integrationsmutagenese des lysR3-Gens in dem Lysinproduzenten DSM 5715 bzw. in dem Valinproduzenten FERM BP-1763

Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1lysR3int wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in Corynebacterium glutamicum DSM 5715 bzw. Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten. Bei dem Stamm FERM BP-1763 handelt es sich um einen Isoleucin und Methionin bedürftigen Valin-Produzenten. Der Vektor pCR2.1lysR3int kann in DSM 5715 bzw. FERM BP-1763 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 bzw. FERM BP-1763 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1lysR3int erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

Für den Nachweis der Integration wurde das lysR3int-Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert. Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen SalI, SacI und HindIII geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1lysR3int hatte innerhalb des chromosomalen lysR3-Gens ins Chromosom von DSM 5715 bzw. FERM BP-1763 inseriert. Die Stämme wurden als DSM5715::pCR2.1lysR3int bzw. FERM BP-1763::pCR2.1lysR3int bezeichnet.

Beispiel 5

Herstellung von L-Lysin und L-Valin

Die in Beispiel 4 erhaltenen *C. glutamicum* bzw. *B. lactofermentum* Stämme DSM5715::pCR2.1lysR3int und FERM BP-
5 1763::pCR2.1lysR3int wurden in einem zur Produktion von L-Lysin und L-Valin geeigneten Nährmedium kultiviert und der L-Lysin- bzw. L-Valingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

10 Dazu wurden die Stämme zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4
eingestellt

15 Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 24 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM
20 verwendet

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l
Salze:	
(NH ₄) ₂ SO ₄)	25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
CaCO ₃	25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte CaCO₃ zugesetzt. Für die Kultivierung von DSM 5715 wurde dem Medium zusätzlich 0,1 g/l Leucin zugesetzt. Für die Kultivierung von FERM BP-1763 wurden zusätzlich 0,1 g/l Isoleucin und 0,1 g/l Methionin zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete L-Lysin- bzw. L-Valinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma

Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustausch-Chromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In den Tabellen 1 bzw. 2 sind die Ergebnisse des Versuchs
5 dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	7,5	13,01
DSM5715::pCR2.1lysR3int	7,6	15,04

Tabelle 2

Stamm	OD(660)	Valin g/l
FERM BP-1763	12,1	7,49
FERM BP- 1763::pCR2.1lysR3int	12,5	8,67

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das lysR3-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000183 BT

<140>

10 <141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1032

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (201)..(830)

<223> lysR3-Gen

25

<400> 1

gatgatcaaa tacttctaga tgatcatgat aatgggcagg gatttgatgt ggcagaagtg 60

atccgtaaaa aatccattgg actgcccaca gcgcaacgcc gggctgaagg gctgggcgga 120

30

acaataatta ttgaatctac aatcggatcg ggaactggaa tttccgccg ttttcctat 180

ccacaaaagg accaagataa gtg atc cgt att ctg ttg gct gat gat cat ccc 233

35

Met Ile Arg Ile Leu Leu Ala Asp Asp His Pro
1 5 10

gtt gtt cgc gca ggc ctt gcc tcc ttg ctg gtg agt gaa gat gat ttt 281

Val Val Arg Ala Gly Leu Ala Ser Leu Leu Val Ser Glu Asp Asp Phe
15 20 25

40

gag ata gtg gac atg gtg ggc acc cca gat gat gcc gtt gcg cgc gcc 329

Glu Ile Val Asp Met Val Gly Thr Pro Asp Asp Ala Val Ala Arg Ala
30 35 40

gcg gaa ggc ggg gtg gat gtg gtg ttg atg gat ctg cgt ttt ggt gat 377

Ala Glu Gly Gly Val Asp Val Val Leu Met Asp Leu Arg Phe Gly Asp
45 50 55

caa cca ggc atc gag gtc gcc ggc ggg gta gag gca acg cgt cgc atc 425

50

Gln Pro Gly Ile Glu Val Ala Gly Gly Val Glu Ala Thr Arg Arg Ile
60 65 70 75

cgt gcg ctg gac aac ccg cca cag gta ctg gtg gtg acc aac tac tcc 473

55

Arg Ala Leu Asp Asn Pro Pro Gln Val Leu Val Val Thr Asn Tyr Ser
80 85 90

aca gac ggc gat gtg gtg ggc gca gta tct gct ggt gcc gtg ggg tat 521

Thr Asp Gly Asp Val Val Gly Ala Val Ser Ala Gly Ala Val Gly Tyr
95 100 105

5 ttg ctc aaa gat agc tcc cca gaa gat ctc att gcc ggt gtt cgc gat 569
 Leu Leu Lys Asp Ser Ser Pro Glu Asp Leu Ile Ala Gly Val Arg Asp
 110 115 120

10 gcc gcg cgg gga gaa tca gtg ctt tca aag cag gtc gcc agc aag atc 617
 Ala Ala Arg Gly Glu Ser Val Leu Ser Lys Gln Val Ala Ser Lys Ile
 125 130 135

15 atg ggg cgg atg aac aac ccc atg act gct ctc agt gcc aga gaa att 665
 Met Gly Arg Met Asn Asn Pro Met Thr Ala Leu Ser Ala Arg Glu Ile
 140 145 150 155

20 gaa gtg ctg tcc ttg gtg gcg caa ggg caa agc aat aga gaa atc ggc 713
 Glu Val Leu Ser Leu Val Ala Gln Gly Gln Ser Asn Arg Glu Ile Gly
 160 165 170

25 aag aaa ctt ttc ctc act gag gcc acg gtg aaa agt cac atg ggg cat 761
 Lys Lys Leu Phe Leu Thr Glu Ala Thr Val Lys Ser His Met Gly His
 175 180 185

30 gtg ttc aac aag ctg gat gtc acc tct aga aca gct gcg gta gct gaa 809
 Val Phe Asn Lys Leu Asp Val Thr Ser Arg Thr Ala Ala Val Ala Glu
 190 195 200

35 gcc aga cag cgc gga att atc tagacgcaca cgtgttggtgta accgatcaca 860
 Ala Arg Gln Arg Gly Ile Ile
 205 210

40 ccagcgcacg ctgctaattct tcactccatg aacaagggtgc agcgcaggtc actgatggcg 920
 ttgtgcatga cgggtggcatt tgctggagga agcctgaccg cgtgcacacc tcgtcctgat 980
 accgcagacc ccatcgcaga ggaattcctt caagcttggg catcgcaaga tt 1032

45 <210> 2
 <211> 210
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

50 <400> 2
 Met Ile Arg Ile Leu Leu Ala Asp Asp His Pro Val Val Arg Ala Gly
 1 5 10 15

55 Leu Ala Ser Leu Leu Val Ser Glu Asp Asp Phe Glu Ile Val Asp Met
 20 25 30

60 Val Gly Thr Pro Asp Asp Ala Val Ala Arg Ala Ala Glu Gly Gly Val
 35 40 45

65 Asp Val Val Leu Met Asp Leu Arg Phe Gly Asp Gln Pro Gly Ile Glu
 50 55 60

70 Val Ala Gly Gly Val Glu Ala Thr Arg Arg Ile Arg Ala Leu Asp Asn
 65 70 75 80

75 Pro Pro Gln Val Leu Val Val Thr Asn Tyr Ser Thr Asp Gly Asp Val
 85 90 95

Val Gly Ala Val Ser Ala Gly Ala Val Gly Tyr Leu Leu Lys Asp Ser
100 105 110

5 Ser Pro Glu Asp Leu Ile Ala Gly Val Arg Asp Ala Ala Arg Gly Glu
115 120 125

Ser Val Leu Ser Lys Gln Val Ala Ser Lys Ile Met Gly Arg Met Asn
130 135 140

10 Asn Pro Met Thr Ala Leu Ser Ala Arg Glu Ile Glu Val Leu Ser Leu
145 150 155 160

Val Ala Gln Gly Gln Ser Asn Arg Glu Ile Gly Lys Lys Leu Phe Leu
15 165 170 175

Thr Glu Ala Thr Val Lys Ser His Met Gly His Val Phe Asn Lys Leu
180 185 190

20 Asp Val Thr Ser Arg Thr Ala Ala Val Ala Glu Ala Arg Gln Arg Gly
195 200 205

Ile Ile
210

25

<210> 3
<211> 323
30 <212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> lysR3int

35 <400> 3

gatgtggtgt tgatggatct gcgttttggg gatcaaccag gcatcgaggt cgccggcggg 60
gtagaggcaa cgctcgcat ccgtgcgctg gacaaccgc cacaggtact ggtggtgacc 120
aactactcca cagacggcga tgtggtgggc gcagtatctg ctggtgccgt ggggtatttg 180
40 ctcaaagata gctcccaga agatctcatt gccggtgttc gcgatgccgc gcggggagaa 240
tcagtgtttt caaagcaggt cgccagcaag atcatggggc ggatgaacaa ccccatgact 300
gctctcagtg ccagagaaat tga 323

45

Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1lysR3int.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

KmR: Kanamycin Resistenz-Gen

EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI

lysR3int: internes Fragment des lysR3-Gens

ColE1 ori: Replikationsursprung des Plasmids ColE1

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das lysR3-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens zu 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators LysR3 aufweist.
- 20 2. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Coryneforme Bakterien, in denen das lysR3-Gen abgeschwächt, bevorzugt ausgeschaltet wird.
7. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Valin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man folgende Schritte durchführt,
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das lysR3-Gen abschwächt,
 - b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

10. Verfahren gemäß Anspruch 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man die Expression des (der) Polynukleotids(e),
das (die) für das lysR3-Gen kodiert (kodieren)
5 verringert, insbesondere ausschaltet.
11. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die
regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids
herabsetzt, für das das Polynukleotid lysR3 kodiert.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man für die Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Lysin, Bakterien fermentiert, in denen
man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
15 ausgewählt aus der Gruppe
- 12.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,
- 12.2 das für die Enolase kodierende Gen eno,
- 12.3 das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf,
- 20 12.4 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 12.5 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
verstärkt, bevorzugt überexprimiert.
13. Verfahren gemäß Anspruch 7,
25 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
ausgewählt aus der Gruppe:
- 13.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck,

13.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende Gen *pgi*,

13.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
abschwächt.

5 14. Verfahren gemäß Anspruch 7,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man für die Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Valin, Bakterien fermentiert, in denen
man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
10 ausgewählt aus der Gruppe

14.1 die für die Acetohydroxysäuresynthase
kodierenden Gene *ilvBN*,

14.2 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende
ilvD-Gen,

15 14.3 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase
kodierende *mgo*-Gen abschwächt.

15. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
20 dass man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium*
glutamicum bzw. *Brevibacterium lactofermentum*
einsetzt.

16. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder
25 Gene zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator
LysR3 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der
Sequenz des *lysR3*-Gens aufweisen,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
dass man die Polynukleotidsequenzen gemäß den
30 Ansprüchen 1 bis 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.

Neue für das lysR3-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Zusammenfassung

Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

20 und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das lysR3-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Plasmidkarte von pCR2.1lysR3int

